

**1. 試験表題**

RK-156, RK-261 及び RK-364 の細菌を用いる復帰突然変異試験

**2. 試験番号**

13K6178N

**3. 試験目的**

RK-156, RK-261 及び RK-364 の遺伝子突然変異誘発性を TA98, TA100 及び WP2<sup>uvrA</sup> を用いて、プレインキュベーション法により検討した。

**4. 試験委託者**

独立行政法人 理化学研究所

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

TEL 045-503-7016 FAX 045-503-7015

試験委託担当者：石井 保之

**5. 試験施設**

株式会社シミックバイオリサーチセンター

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

**6. 試験実施**

試験期間 2013年11月11日 ～ 2013年11月19日

試験開始日 2013年11月11日

前培養開始日 2013年11月11日

処理日 2013年11月12日

コロニー計測 2013年11月14日

試験終了日 2013年11月19日

**7. 試験責任者**

株式会社シミックバイオリサーチセンター

山中妙子

**8. GLP 及びガイドライン**

遵守した GLP : GLP 非適用

参照したガイドライン : 「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」

(厚生労働省医薬食品局審査管理課長, 平成 24 年 9 月 20 日薬食審査発 0920 第 2 号)

**9. 試験関係資料の保存**

試験資料は最終報告書の提出とともに返却した。

## 10. 試験材料及び方法

### 10.1. 被験物質及び対照物質

名称 : RK-156, RK-261 及び RK-364  
ロット番号 : TT130830 (RK-156)  
062-101-033-29 (RK-261)  
062-101-012-2 (RK-364)  
供給元 : 独立行政法人 理化学研究所  
受領日 : 2013 年 11 月 6 日  
保存条件 : 常温 (許容値 : 15-25°C)  
保存場所 : 第 3 動物実験棟 検体調製室 常温保管庫  
残余被験物質の管理 : 実験終了後, すべて被験物質管理責任者に移管した。

#### 10.1.1. 陰性対照物質

名称 : ジメチルスルホキシド (以下, DMSO と略す)  
ロット番号 : PDM2827  
供給元 : 和光純薬工業株式会社

#### 10.1.2. 陽性対照物質

##### 10.1.2.1. 代謝活性化系非存在下 (-S9 mix 法)

名称 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (以下, AF-2 と略す)  
ロット番号 : STQ3987  
純度 : 99.7%  
保存条件 : 室温  
供給元 : 和光純薬工業株式会社

##### 10.1.2.2. 代謝活性化系存在下 (+S9 mix 法)

名称 : 2-aminoanthracene (以下, 2AA と略す)  
ロット番号 : DCK3519  
純度 : 96.5%  
保存条件 : 室温  
供給元 : 和光純薬工業株式会社

#### 10.1.3. 選択理由

陽性対照物質及び濃度は, 背景データが豊富なため選定した。

## 10.2. 被験物質液及び陽性対照物質液の調製

### 10.2.1. 被験物質液

調製 : 委託者で調製  
被験物質濃度 : 計 7 段階の濃度液 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 50 mg/mL)

### 10.2.2. 陽性対照物質液

DMSOに溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結保存したものを用時に解凍して用いた。  
下記に調製濃度を示した。

化学物質名	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
AF-2	0.1, 1.0
2AA	5, 10, 100

### 10.3. 使用菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	日本バイオアッセイ研究センター	2002年2月6日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100		
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門 (NBRC)	2007年7月14日

#### 10.3.1. 選択理由

遺伝毒性試験ガイドラインで示された菌株であり、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されているため選択した。

### 10.4. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

以下の組成である市販品 (バイタルメディア AMT-S 培地, Lot No. DZAE8601, 極東製薬工業株式会社) を用いた。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2 g/L
クエン酸・1水塩	2.0 g/L
リン酸二カリウム・無水塩	10.0 g/L
リン酸一アンモニウム	1.92 g/L
水酸化ナトリウム	0.66 g/L
ブドウ糖	20.0 g/L
寒天末	15.0 g/L

### 10.5. トップアガー

加温溶解した軟寒天溶液 [Bacto Agar (Becton, Dickinson) : 0.6%, 塩化ナトリウム : 0.5%]  
に、アミノ酸溶液 [0.5 mmol/L ヒスチジン-0.5 mmol/L ビオチン-0.5 mmol/L トリプトファン混  
合溶液] を 1/10 容量加えた。なお、調製後、約  $45^{\circ}\text{C}$  で保温し使用した。

## 10.6. S9 mix

## 10.6.1. S9

以下の市販ラット肝 S9 を用いた。

使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性／週齢	雄／7 週齢
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量 及び 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1 日目) 60 mg/kg 3回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
供給元	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	13061403

## 10.6.2. コファクター

グルコース-6-リン酸, NADPH 及び NADH (オリエンタル酵母工業株式会社) を 0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液に溶解し, 濾過滅菌 ( $\phi$  0.45  $\mu$ m) した後 MgCl<sub>2</sub>-KCl 溶液を加えたものを使用した。なお, 調製したコファクターは, 使用するまで氷冷下で保存した。

## 10.6.3. S9 mix の調製

S9 とコファクターを 1 : 9 の割合で混合した。以下に S9 mix 中のコファクターの成分濃度を示した。

塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol/mL
塩化カリウム	33 $\mu$ mol/mL
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol/mL
NADPH	4 $\mu$ mol/mL
NADH	4 $\mu$ mol/mL
リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4	100 $\mu$ mol/mL

## 10.7. 試験方法

## 10.7.1. 群構成

菌株ごとに, 代謝活性化系非存在下 (-S9 mix 法) 及び代謝活性化系存在下 (+S9 mix 法) について実施した。計 7 用量 (3.00, 10.0, 30.0, 100, 300, 1000 及び 5000  $\mu$ g/plate) を設けた。

1 用量当たりのプレート数は 2 枚とし、陰性対照及び陽性対照を設けた。陽性対照は共通とした。陽性対照の用量を下記に示した。

菌 株	代謝活性化系非存在下 (-S9mix法)		代謝活性化系存在下 (+S9mix法)	
	化学物質名	用量 (µg/plate)	化学物質名	用量 (µg/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1.0
WP2 <i>uvrA</i>		0.01		10.0
TA98		0.1		0.5

#### 10.7.2. 菌懸濁液の調製

三角フラスコに入れた濃度 25 g/L ニュートリエントブロス培養液 (Lot No. 876774, Oxoid, Ltd.) 25 mL に菌懸濁液 50 µL を接種し、37°C で 10 時間振盪培養した。培養終了後、濁度 (OD) を波長 660 nm で測定し、菌数が  $1.0 \times 10^9$  個/mL 以上であることを確認した (核酸蛋白質分光光度計: BioSpec-mini, 株式会社島津製作所)。下表に生菌数を示した。

菌株名	TA100	WP2 <i>uvrA</i>	TA98
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	3.66	7.75	5.85

#### 10.7.3. 試験操作法

37°C, 20 分間のプレインキュベーション法を採用した。

陰性対照物質液、陽性対照物質液または被験物質液 0.1 mL に、-S9 mix 法では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, +S9 mix 法では S9 mix を 0.5 mL 加えた後、菌懸濁液 0.1 mL を入れ、攪拌後、37°C で 20 分間振盪 (振盪回数 72~78 回/分) した。20 分後にトップアガー-2.0 mL を加え、攪拌後プレート上に均一に重層し、37°C で 48 時間培養した。

#### 10.7.4. 無菌試験

試験操作時に雑菌の混入がないことを確認するために、被験物質液と S9 mix について無菌試験を実施した。最高濃度の被験物質液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL に、トップアガー-2.0 mL を加えてプレート上に重層し、37°C で 48 時間培養した。その結果、雑菌の混入はなかった。

### 10.8. コロニーの計数及び観察

#### 10.8.1. コロニーの計測

TA100 株及び陽性対照群のプレートはコロニーアナライザー (CA-11D, システムサイエンス株式会社) を用いて計測し、他のプレートは用手法で計測した。ME8973 の -S9mix 法では、TA100 株の 500 µg/plate については析出によりコロニーアナライザーでの計測が困難なため

用手法で計測した。

#### 10.8.2. 観察

析出の有無：コロニー計測時に目視した。

生育阻害状況（菌のバックグラウンドの生育）：実体顕微鏡で観察した。

#### 10.9. 試験の成立条件

本試験結果は以下の全ての条件を満たしていたことから、試験が成立したと判断した。

- 1) 陰性対照及び陽性対照値が背景値の変動範囲内であること（添付資料参照）。
- 2) 生育阻害の認められない用量が4用量以上であること。
- 3) 無菌試験の結果、雑菌による汚染が無いこと。

#### 10.10. 統計学的処理

各菌における被験物質の各用量、陰性及び陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値を算出した。また、被験物質群の用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を図に示した。統計学的検定は行わなかった。

#### 11. 試験結果

被験物質群の用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を図に示した。

結果を Table 1~3 及び Figure 1~3 に示した。

RK-156, RK-261 及び RK-364 は S9 mix の有無にかかわらず全菌株及びいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害は認められなかった。また、いずれの被験物質も析出は 300 µg/plate 以上の用量で認められた。

#### 12. 考察及び結論

RK-156, RK-261 及び RK-364 の細菌を用いる復帰突然変異について、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の計3菌株を用いて、プレインキュベーション法により代謝活性化系非存在下 (-S9 mix 法) と代謝活性化系存在下 (+S9 mix 法) で復帰突然変異試験を行った。

RK-156, RK-261 及び RK-364 はいずれの菌においても陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数は認められなかった。

以上の結果より、本試験の条件下において遺伝子突然変異誘発性は陰性と判断した。

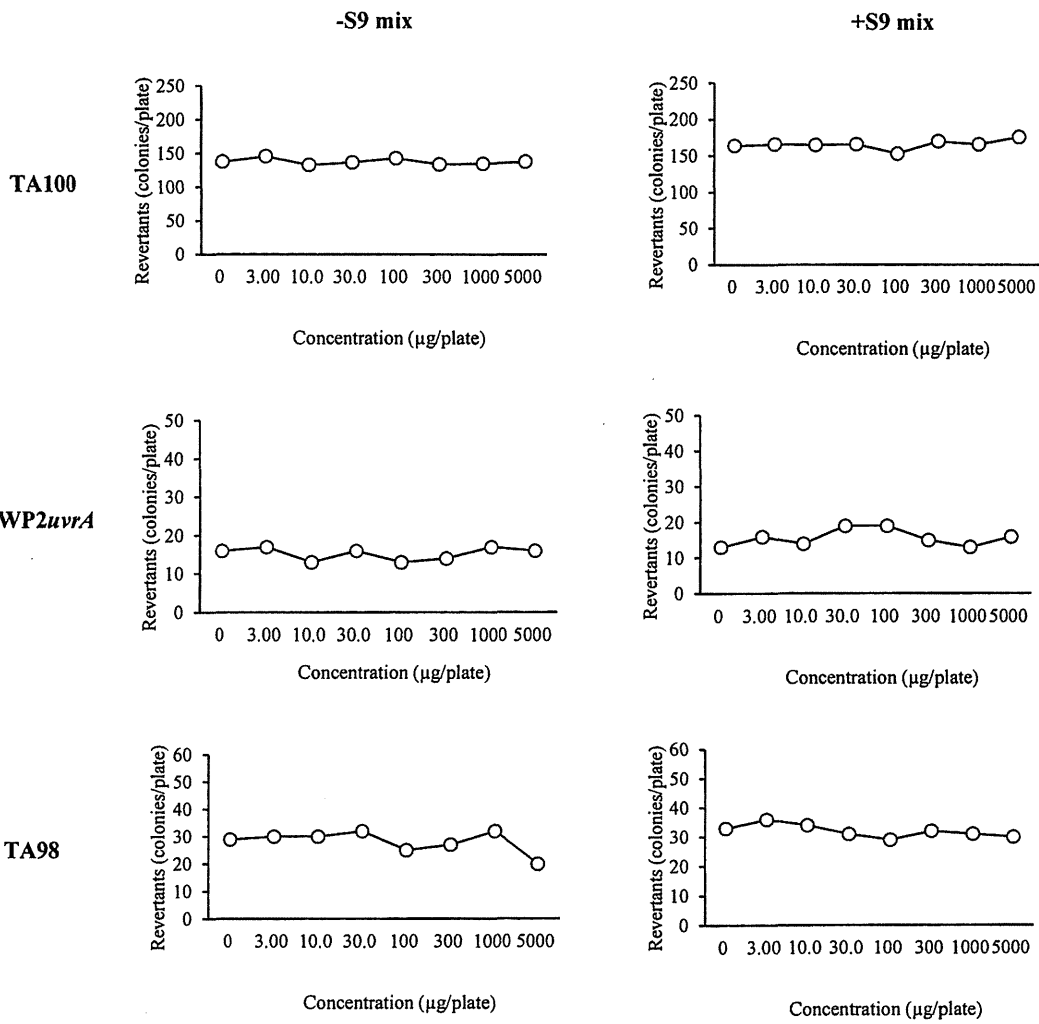


Figure 1 Dose-response curve (RK-156)

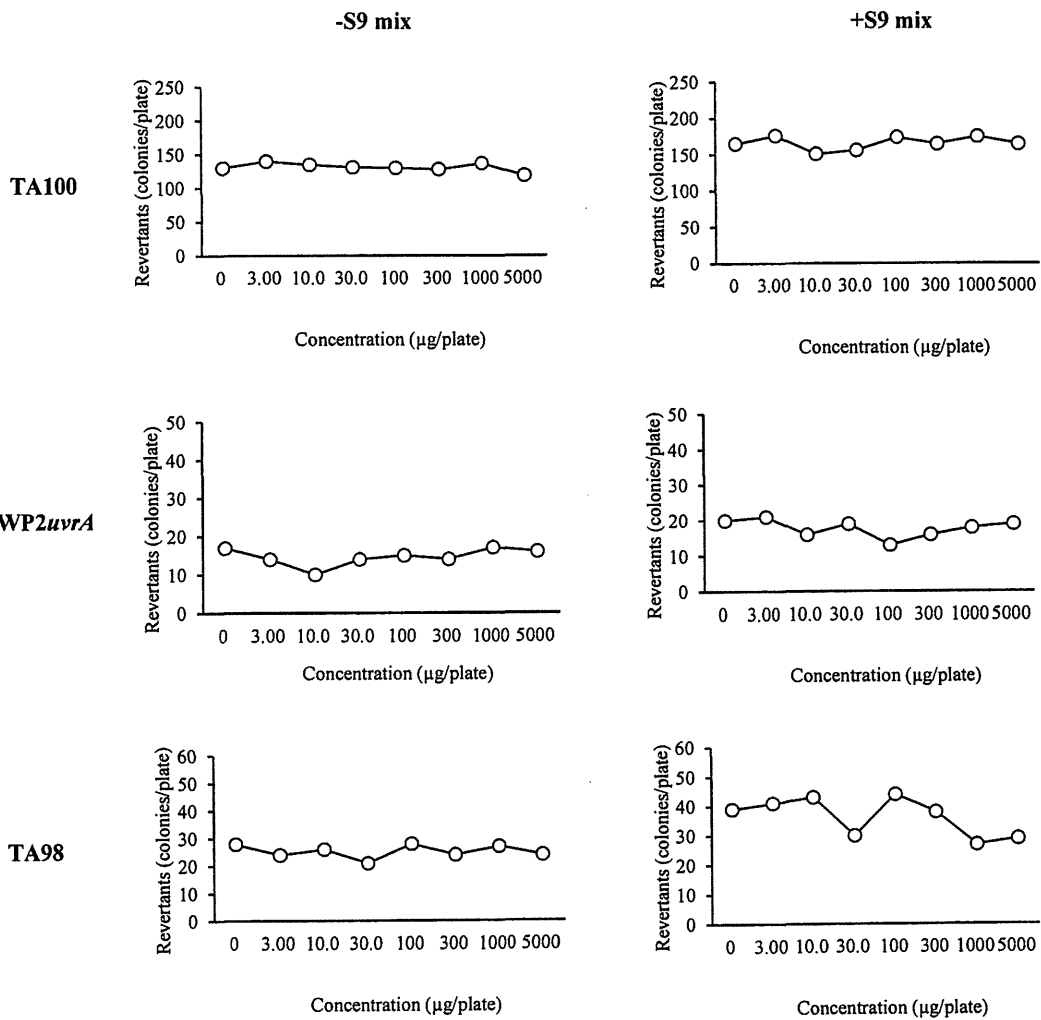


Figure 2 Dose-response curve (RK-261)



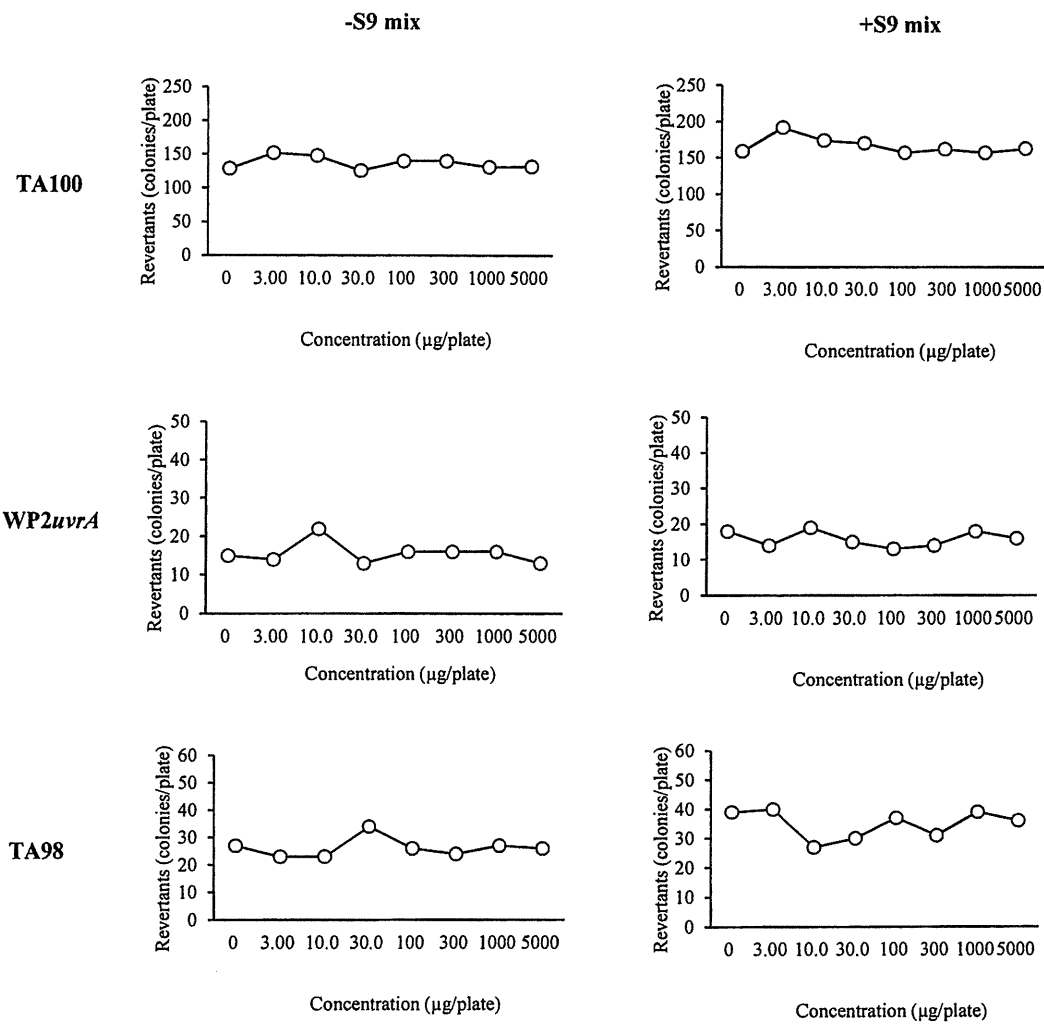


Figure 3 Dose-response curve (RK-364)

Table 1 Dose-response curve (RK-156)

Study period: November 11 to 14, 2013

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertants (colonies/plate)						
		Base-pair substitution type				Flame shift type		
		TA100		WP2 $uvrA$		TA98		
		count	mean	count	mean	count	mean	
- S9 mix	Negative control (DMSO)	-	148	(138)	20	( 16)	29	( 29)
			127		12		29	
	3.00		139	(146)	18	( 17)	26	( 30)
			153		15		33	
	10.0		136	(133)	16	( 13)	32	( 30)
			130		10		27	
	30.0		140	(137)	13	( 16)	37	( 32)
			134		18		27	
	100		140	(143)	12	( 13)	29	( 25)
			145		14		21	
	300 #		134	(134)	16	( 14)	32	( 27)
			134		12		21	
	1000 #		135	(135)	14	( 17)	30	( 32)
			135		19		33	
	5000 #		129	(138)	16	( 16)	24	( 20)
			146		15		16	
AF-2	0.01		624	(637)	76	( 73)	-	
			650		70		-	
	0.1	-	-	-	-	404	(420)	
		-	-	-	-	436		
+ S9 mix	Negative control (DMSO)	-	168	(164)	13	( 13)	39	( 33)
			160		13		26	
	3.00		160	(166)	13	( 16)	38	( 36)
			172		18		34	
	10.0		177	(165)	18	( 14)	32	( 34)
			153		9		35	
	30.0		156	(166)	13	( 19)	24	( 31)
			176		25		37	
	100		164	(153)	18	( 19)	37	( 29)
			141		19		21	
	300 #		176	(170)	14	( 15)	30	( 32)
			164		16		34	
	1000 #		175	(166)	13	( 13)	31	( 31)
			157		12		31	
	5000 #		167	(176)	17	( 16)	32	( 30)
			185		15		27	
2AA	0.5		-	-	-	372	(395)	
			-	-	-	418		
	1.0		1137	(1110)	-	-	-	
			1082		-	-	-	
10.0		-	-	1150	(1079)	-		
		-	-	1008		-		

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene.

( ): Mean

#: Precipitation of the test substance was observed

Table 2 Dose-response curve (RK-261)

Study period: November 11 to 14, 2013

Compound	Dose (µg/plate)	Revertants (colonies/plate)						
		Base-pair substitution type				Flame shift type		
		TA100		WP2 $uvrA$		TA98		
		count	mean	count	mean	count	mean	
- S9 mix	Negative control (DMSO)	-	114	(130)	16	( 17)	22	( 28)
			145		17		33	
	3.00		139	(140)	16	( 14)	29	( 24)
			141		12		19	
	10.0		142	(135)	6	( 10)	30	( 26)
			127		14		22	
	30.0		121	(131)	17	( 14)	18	( 21)
			141		11		24	
	100		142	(130)	15	( 15)	20	( 28)
			117		15		36	
	300 #		134	(128)	13	( 14)	23	( 24)
			122		15		25	
	1000 #		127	(137)	18	( 17)	26	( 27)
			146		15		27	
	5000 #		113	(119)	17	( 16)	24	( 24)
			125		14		24	
AF-2	0.01	624	(637)	76	( 73)	-		
		650		70		-		
	0.1	-		-		404	(420)	
		-		-		436		
+ S9 mix	Negative control (DMSO)	-	167	(165)	17	( 20)	40	( 39)
			163		23		37	
	3.00		184	(176)	22	( 21)	36	( 41)
			168		19		45	
	10.0		146	(151)	19	( 16)	42	( 43)
			156		12		44	
	30.0		140	(156)	17	( 19)	28	( 30)
			172		21		32	
	100		172	(174)	14	( 13)	43	( 44)
			176		12		45	
	300 #		152	(165)	16	( 16)	46	( 38)
			178		16		30	
	1000 #		184	(175)	17	( 18)	28	( 27)
			166		18		26	
	5000 #		154	(165)	18	( 19)	29	( 29)
			176		20		29	
2AA	0.5	-		-		372	(395)	
		-		-		418		
	1.0	1137	(1110)	-		-		
	1082		-		-			
10.0		-		1150	(1079)	-		
		-		1008		-		

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene.

( ): Mean

#: Precipitation of the test substance was observed

Table 3 Dose-response curve (RK-364)

Study period: November 11 to 14, 2013

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertants (colonies/plate)						
		Base-pair substitution type				Flame shift type		
		TA100		WP2 $uvrA$		TA98		
		count	mean	count	mean	count	mean	
-S9 mix	Negative control (DMSO)	—	122 (129)	13 (15)	31 (27)	136	23	
		3.00	153 (152)	14 (14)	27 (23)	151	19	
	RK-364	10.0	156 (148)	19 (22)	25 (23)	139	20	
		30.0	128 (126)	15 (13)	39 (34)	123	28	
		100	147 (140)	22 (16)	24 (26)	132	27	
		300 #	145 (140)	14 (16)	21 (24)	134	26	
		1000#	137 (131)	19 (16)	31 (27)	124	23	
		5000#	136 (132)	12 (13)	29 (26)	127	23	
		0.01	624 (637)	76 (73)	—	650	—	
		0.1	—	—	—	—	404 (420)	
	+ S9 mix	Negative control (DMSO)	—	154 (159)	25 (18)	35 (39)	164	43
			3.00	181 (192)	7 (14)	43 (40)	203	37
		RK-364	10.0	176 (174)	17 (19)	26 (27)	172	28
			30.0	156 (170)	14 (15)	28 (30)	183	32
			100	150 (157)	15 (13)	38 (37)	163	36
			300 #	167 (162)	10 (14)	27 (31)	157	34
1000#			158 (157)	19 (18)	38 (39)	156	40	
5000#			160 (163)	16 (16)	38 (36)	165	34	
0.5			—	—	372 (395)	—	418	
1.0			1137 (1110)	—	—	1082	—	
2AA		10.0	—	1150 (1079)	—	—	—	
		—	—	1008	—	—	—	

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene.

( ): Mean

#: Precipitation of the test substance was observed

添付資料 陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

データ集計期間：2007年3月～2013年3月

陰性対照値

株名	S9 mix	背景データ					変動範囲
		データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	－	627	80	161	116	11.6	81-150
	＋	616	84	206	129	12.1	92-165
WP2 <i>uvrA</i>	－	573	10	56	21	5.9	3-39
	＋	564	12	46	24	5.8	7-42
TA98	－	628	11	33	19	3.2	10-29
	＋	716	16	45	28	4.1	15-40

陽性対照値

	陽性対照物質及び 用量 (µg/plate)	S9 mix	背景データ					変動範囲
			データ数	最小値	最大値	平均値	標準偏差	
TA100	AF-2 : 0.01	－	546	332	814	492	86.6	232-752
	2AA : 1.0	＋	535	136	1311	890	175.6	363-1417
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2 : 0.01	－	524	72	461	111	36.2	72-220
	2AA : 10.0	＋	513	176	1052	496	194.5	176-1080
TA98	AF-2 : 0.1	－	547	68	746	446	86.2	187-704
	2AA : 0.5	＋	549	129	515	289	49.5	141-438

株ごとに、平均値 (Mean) , 標準偏差 (S.D.) を算出し、変動範囲 (Mean±3S.D.) を設定した。  
 ただし、変動範囲の下限値が0以下になった場合は、コロニー数の最小値を下限値とした。陽性対照値の変動範囲の下限値が陰性対照値の変動範囲の上限以下になる場合は、陽性対照値の最小値を変動範囲の下限値とした。

当該資料は原本を正確に複写した  
ものであり、原本と相違ないことを  
保証いたします。

株式会社新日本科学 安全性研究所

試験責任者 伴 昌明

日付 2014年 1月 14日

最終報告書

表題： LRX, LRY 及び LRZ の hERG 導入 HEK293 細胞のカリウム電流に対する  
試験

試験番号： SBL366-002

試験責任者： 伴 昌明

署名 伴 昌明 2014年 1月 14日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 13 頁

## 目 次

要 約	3
1. 試験目的	4
2. 適用規則	4
3. 試験委託者	4
4. 試験施設	4
5. 試験日程	4
6. 材料及び方法	4
6.1 被験物質	4
6.1.1 被験物質-1	4
6.1.2 被験物質-2	5
6.1.3 被験物質-3	5
6.2 被験物質の調製	5
6.3 被験物質の適用	6
6.4 試験系（細胞）と培養条件	6
6.4.1 試験系（細胞）	6
6.4.2 培養条件	7
6.5 試験群構成	7
6.6 試験方法	7
6.6.1 培養	7
6.6.2 カリウム電流測定	8
6.7 統計学的手法	9
7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかったこと	9
8. 結果及び考察	10
8.1 LRX	10
8.2 LRY	10
8.3 LRZ	10
9. 試験責任者，その他の試験に従事した者の氏名	11
10. 記録及び資料の保存	11
別添 1 Table	12
1 Effects of LRX, LRY, and LRZ on tail peak currents in hERG transfected HEK293 cells	13

## 要 約

LRX, LRY 及び LRZ の human ether-a-go-go-related gene (hERG) 導入 human embryonic kidney (HEK293) 細胞のカリウム電流 (hERG 電流) に対する作用を, tail peak current を指標としてホールセルパッチクランプ法により評価した. LRX, LRY 及び LRZ の 10 µg/mL を室温条件下, 灌流により hERG 導入 HEK293 細胞にそれぞれ適用した. 1群当たりの例数は2例とした.

LRX

LRX の 10 µg/mL を適用したときの tail peak current は, 適用前の 91.55%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

LRY

LRY の 10 µg/mL を適用したときの tail peak current は, 適用前の 98.70%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

LRZ

LRZ の 10 µg/mL を適用したときの tail peak current は, 適用前の 94.95%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

以上, 本試験条件下において, LRX, LRY 及び LRZ の 10 µg/mL は, hERG 導入 HEK293 細胞の hERG 電流に対して影響を与えなかった.



1. 試験目的

LRX, LRY 及び LRZ の human ether-a-go-go-related gene (hERG) 導入 human embryonic kidney (HEK293) 細胞のカリウム電流 (hERG 電流) に対する作用を評価した。

2. 適用規則

本試験は、適用規則なしとした。

3. 試験委託者

独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22  
TEL : 045-503-7016/7017 FAX : 045-503-7017

4. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所  
〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地  
TEL : 099-294-2600 FAX : 099-294-3619

5. 試験日程

試験開始日 :	2013 年 10 月 28 日
測定操作開始日 :	2013 年 10 月 30 日
測定終了日 :	2013 年 10 月 30 日
試験終了日 :	2014 年 1 月 14 日

6. 材料及び方法

6.1 被験物質

6.1.1 被験物質-1

名称 :	LRX
提供者 :	独立行政法人理化学研究所
ロット番号 :	RMJ-MD021
濃度 :	1 mg/mL
受領日 :	2013 年 10 月 7 日
入手日 :	2013 年 10 月 29 日
入手量 :	1.2 mL × 2 本 (2.4 mL)
保存条件 :	冷蔵 (凍結を避けて保存)
保存場所 :	被験物質保管所内冷蔵室 [受領日～返却日 (2013 年 10 月 7 日～2013 年 12 月 10 日), 実測値:2.4～5.0°C (許容範囲:2～8°C)]
取扱い :	マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。

残余被験物質-1 : 未開封のみ、すべて試験委託者に返却した。

#### 6.1.2 被験物質-2

名称 : LRY  
提供者 : 独立行政法人理化学研究所  
ロット番号 : RMJ-MD022  
濃度 : 1 mg/mL  
受領日 : 2013年10月7日  
入手日 : 2013年10月29日  
入手量 : 1.2 mL × 2本 (2.4 mL)  
保存条件 : 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
保存場所 : 被験物質保管所内冷蔵室 [受領日～返却日 (2013年10月7日～2013年12月10日), 実測値: 2.4～5.0°C (許容範囲: 2～8°C)]  
取扱い : マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。  
残余被験物質-2 : 未開封のみ、すべて試験委託者に返却した。

#### 6.1.3 被験物質-3

名称 : LRZ  
提供者 : 独立行政法人理化学研究所  
ロット番号 : RMJ-MD023  
濃度 : 1 mg/mL  
受領日 : 2013年10月7日  
入手日 : 2013年10月29日  
入手量 : 1.2 mL × 2本 (2.4 mL)  
保存条件 : 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
保存場所 : 被験物質保管所内冷蔵室 [受領日～返却日 (2013年10月7日～2013年12月10日), 実測値: 2.4～5.0°C (許容範囲: 2～8°C)]  
取扱い : マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。  
残余被験物質-3 : 未開封のみ、すべて試験委託者に返却した。

#### 6.2 被験物質の調製

調製濃度 : 1 mg/mL  
調製方法 : 被験物質をそのまま使用した。

## 6.3 被験物質の適用

適用器材（灌流系）：	50 mL プラスチックシリンジ（ニプロシリンジ GA 50 mL, ニプロ株式会社） プラスチックジョイント [for 1.5 mm（内径） tube, Value Plastics, Inc.] 70 cm プラスチックチューブ [Tygon2275 4.8 mm（外径）× 1.6 mm（内径）, サンゴバン株式会社] 3 cm ガラス管 [テルモヘマトクリット毛細管 1.55 mm（外径）× 0.89 mm（内径）, テルモ株式会社]
適用方法：	被験物質を Tyrode 液で用時に 100 倍希釈し、適用液とした。適用液は、35 mm 細胞培養ディッシュ（Collagen Type I -coated, 旭硝子株式会社）内の細胞にシリンジポンプ（CFV-3200, 日本光電工業株式会社）を用いて 2 mL/min で 7 分以上灌流した。
適用方法の選択理由：	灌流による適用は、一般的に用いられている方法である。
適用濃度：	10 µg/mL
適用条件：	灌流速度 2 mL/min, 細胞培養ディッシュ内灌流時間 7 分以上, 室温

## 6.4 試験系（細胞）と培養条件

## 6.4.1 試験系（細胞）

細胞：	購入した hERG 導入 HEK293 細胞を株式会社新日本科学 安全性研究所にて継代培養して作製し、液体窒素容器中で保存したストックを使用した。ストックは解凍後、継代培養して試験に使用した。
試験系選択理由：	ヒト心室の活動電位の再分極相における rapidly activating component of delayed rectifier potassium current ( $I_{Kr}$ ) に寄与する hERG 電流に対する影響評価において、広く用いられている評価系として選択した。
入手先：	Upstate Ion Channel Discovery Group Ltd.
入手日：	2004 年 6 月 11 日
保存場所：	薬理第 1 研究棟 試験区域（A）内培養室内 液体窒素容器
ロット番号：	11-2-5 (A)
特性検査：	マイコプラズマ汚染のないことを確認している。

## 6.4.2 培養条件

培地： 10% fetal bovine serum (非働化済), 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 100 units/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を含む MEM

培養条件： 細胞は, 25 cm<sup>2</sup> 又は 75 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコ (Corning Incorporated), 35 mm 細胞培養ディッシュ (Collagen Type I-coated, 旭硝子株式会社) に播種し, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベータ (MCO-20AIC, No. P-1, パナソニックヘルスケア株式会社) [細胞解凍日~測定終了日 (2013年10月7日~2013年10月30日), 実測値: 36.2~36.6°C (許容範囲: 35~38°C)] で, 加湿条件下で培養した.

## 6.5 試験群構成

被験物質群 3 群

1 群あたりのデータ数 (細胞数) は, 2 例とした.

群	被験物質	適用濃度 <sup>a)</sup> (µg/mL)	被験物質濃度 <sup>a)</sup> (mg/mL)	希釈倍率 <sup>a)</sup>	データ数 (細胞数)
1	LRX	10	1	100	2
2	LRY	10	1	100	2
3	LRZ	10	1	100	2

a) 被験物質を Tyrode 液で希釈した.

## 6.6 試験方法

## 6.6.1 培養

細胞培養フラスコでサブコンフルエントになるまで培養した継代培養用の細胞を PBS(-)で洗浄し, 0.05% トリプシン-EDTA 溶液で細胞を剥離した後, 培地で回収した. Trypan Blue Stain で染色後, 血球計算盤を用いて生細胞数を算出した. 回収した細胞を遠心分離 (室温, 160×g, 1000 rpm, 5 分間) し, 上清を除去した. 細胞を培地に懸濁させ, 継代培養用として 75 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに 1 フラスコあたり  $2.3 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^6$  個播種した. 電流測定を行う場合, 生細胞を細胞培養ディッシュに 1 ディッシュあたり  $1.0 \times 10^5$  個播種した. 継代培養用に播種した細胞培養フラスコの細胞はサブコンフルエントになるまで培養し, 以降は上記の操作を繰り返した. なお, 細胞を解凍した時点での Passage No. を 1 と定義し, 電流測定には Passage No. 10 の細胞を使用した.